*AMEA-nın Xəbərləri (biologiya elmləri), cild 66, №1, səh. 75-87 (2011)*

# Бикарбонат и Функционирование Фотосистемы II[1]

**Я.М. Фейзиев**
*Институт Ботаники Национальной Академии Наук Азербайджана, Баку AZ1073, Патамдартское шоссе 40, E-mail: feyziyev-y@botany-az.org*

**Изучена роль ионов бикарбоната ($HCO_3^-$) в функционировании фотосистемы II (ФСII). Выяснено, что бикарбонат так же, как и формиат ($HCO_2^-$), являющийся его антогонистом, аналогичным образом действует на переменную флуоресценцию хлорофилла ФСII. Однако, при их совместном действии выход переменной флуоресценции не увеличивается, а напротив, снижается до уровня, наблюдаемого при действии только ионов $HCO_3^-$. Было выявлено, что ионы формиата ингибируют индукцию мультилинейного сигнала ЭПР состояния $S_2$ (g = 2.00) фотосистемы II и почти в равном количестве стимулируют образование сигнала ЭПР (g = 1.82), свойственного акцепторному комплексу $Q_A^{\bullet-}Fe^{2+}$. Присутствие формиата снижает также выход кислорода и вызывает световую индукцию радикала тирозина $Y_Z^{\bullet}$. Однако, предполагается, что ингибирование донорной части ФСII является независимым и не связано с замещением бикарбоната ионами формиата. Полученные результаты дают основание считать акцепторную сторону ФСII центром конкуренции $HCO_3^-/HCO_2^-$. На основе анализа полученных данных допущено, что бикарбонат, связываясь с акцепторной стороной ФСII, замедляет перенос электрона между пластохинонами $Q_A$ и $Q_B$.**

***Ключевые слова:*** *бикарбонат, формиат, фотосинтез, фотосистема II, перенос электрона*

## ВВЕДЕНИЕ

Фотосистема II является важнейшим звеном цепи переноса электрона кислородвыделяющих фотосинтезирующих организмов – растений, водорослей и цианобактерий, катализирующим образование молекулярного кислорода с использованием энергии поглощенного кванта света. Согласно данным кристаллографических исследований, она представляет собой гомодимер, имеющий симметрию вращения второго порядка (Zouni et al., 2001; Kamiya and Shen, 2003; Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005). Фотохимическое ядро мономера ФСII включает полипептиды PsbA и PsbD (обозначаемые как $D_1$ и $D_2$), которые вместе содержат электронные кофакторы, такие как первичный донор электрона $P_{680}$ (мультимер хлорофилла *a*), тирозины $Y_Z$ ($D_1$-$Y^{161}$) и $Y_D$ ($D_2$-$Y^{161}$), акцепторы электрона феофитин (Phe) и пластохиноны $Q_A$ и $Q_B$ вместе со связанным с ними негемовым железом (Debus, 1992; Barber, 2003; 2006).

Поглощение кванта света фотосистемой II вызывает перенос электрона от синглетно-возбужденного первичного донора электрона $P_{680}$ ($P_{680}$*) на молекулу феофитина ($D_1$-Phe) и образование ион-радикальной пары [$P_{680}^{\bullet+}Phe^{\bullet-}$] в реакционном центре (РЦ). Электрон от $Phe^{\bullet-}$ далее последовательно переносится на пластохиноны $Q_A$ и $Q_B$ и в конечном итоге в пул пластохинолов ($PQH_2$), выполняющий роль резервуара для электронов, поступающих от фотосистемы II. Первичный донор электрона, потерявший электрон во время фотореакции ($P_{680}^{\bullet+}$), является сильным окислителем и сам восстанавливается, получив электрон от тирозина $Y_Z$, который, в свою очередь, восстанавливается в результате переноса электрона из кластера Ca-4Mn, служащего каталитическим центром окисления воды[2] (Debus, 1992; Diner and Babcock, 1996). Конечным результатом действия ФСII является окисление воды и высвобождение молекулярного кислорода в атмосферу и протонов в люмен тилакоидной мембраны.

Во время осуществления окисления воды комплекс ФСII в целом проходит через ряд ступеней $S_0$-$S_4$ редокс цикла S, согласно которому молекулярный кислород образуется на заключительной стадии $S_4$-[$S_4$]-$S_0$. Положительные заряды, продуцируемые в S-цикле, накапливаются в кластере Ca-4Mn (Debus, 1992). Кластер Ca-4Mn связан с тирозином $Y_Z$ и стабилизируется тремя периферийными полипептидами PsbO, PsbP и PsbQ кодируемыми ядерным геномом растений (Seidler, 1996).

---

[1]Часть представленного материала была опубликована ранее (Feyziev et al., 2000) однако из-за необходимости реинтерпретации этих данных в свете последних успехов, достигнутых в исследованиях ФСII, мы сочли нужным дополнить их новыми результатами собственных исследований и включать в настоящую статью.

[2]В действительности каталитической единицей окисляющей воды является сам суперкомплекс ФСII в целом, которого можно приравнивать мультисубъединичному энзиму, имеющего в активном центре кластер Ca-4Mn.

Фотосистема II для нормальной функции нуждается в ионах бикарбоната ($HCO_3^-$) (Blubaugh and Govindjee, 1988; Govindjee and van Rensen, 1978; 1993; Stemler, 1982; van Rensen et al., 1999). Удаление бикарбоната вызывает нарушение свето-индуцированного переноса электрона в ФСII, что отражается на процессах, происходящих как в ее РЦ, так и в каталитическом центре окисления воды. Перенос электрона в ФСII, ингибированный вследствие удаления $HCO_3^-$, в случае, если эти реакции не были подвергнуты действию другого повреждающего фактора, вновь может восстанавливаться при его добавлении.

В работах, проведенных на ранних этапах исследования, выдвигалось предположение, что функция бикарбоната в ФСII заключается в участии в процессах, приводящих к выделению кислорода (Metzner, 1978; Stemler, 1980; Stemler et al., 1974; Stemler and Govindjee, 1973). Однако исследованиями, проведенными позже, было выявлено участие электрон-акцепторного комплекса $Q_A$-$Fe^{2+}$ в связывании $HCO_3^-$ (Govindjee and van Rensen, 1978; 1993; Blubaugh and Govindjee, 1988; Eaton-Rye and Govinjee, 1988a; 1988b; Jursinic and Stemler, 1982; 1984), что могло иметь существенное значение для контроля и регуляции активности фотосистемы II, а в качестве высокоаффинного сайта для связывания бикарбоната был предложен $Fe^{2+}$ (Deligiannakis et al., 1994; Diner and Petrouleas, 1990; Hienerwadel and Berthomieu, 1995; Petrouleas et al., 1994; Petrouleas and Diner, 1990).

В этих работах при исследовании роли бикарбоната часто использовали его антагонист – формиат ($HCO_2^-$) для вытеснения его из места связывания. При этом предполагалось, что фотосистема II в присутствии ионов $HCO_3^-$ осуществляет нормальный перенос электрона между пластохинонами $Q_A^{\bullet-}$ и $Q_B$, в то время, как формиат, имея близкую химическую структуру с бикарбонатом, в конкуренции с ним за связывание с $Q_A$-$Fe^{2+}$, замедляет перенос электрона между $Q_A^{\bullet-}$ и $Q_B$.

Начиная с середины 1990-х годов, вопрос о необходимости ионов $HCO_3^-$ для переноса электрона на донорной стороне ФСII был выдвинут на передний план (Klimov et al., 1995a; 1995b; 1997; Wincencjusz et al., 1996; Yruela et al., 1998). В упомянутых работах функцией бикарбоната считалось облегчение им связывания свободного марганца ($Mn^{2+}$) фотосистемой II, поскольку в препаратах, лишенных кластера Ca-4Mn, добавление $HCO_3^-$ стимулировало донирование экзогенного $Mn^{2+}$ на РЦ. Результаты этих экспериментов дали основание предположить, что донорная сторона ФСII, скорее всего, кластер Ca-4Mn также обладает высокой аффинностью для связывания бикарбоната. Одновременно были предложены и другие модели, предполагающие возможную роль $HCO_3^-$ в качестве субстрата вместо воды или вхождение бикарбоната в неорганическое ядро каталитического центра окисления воды в качестве необходимой компоненты на раннем этапе эволюции кислородвыделяющего фотосинтеза (Dismukes et al., 2001; Baranov et al., 2004).

Для внесения ясности в вышеуказанные разногласия, нами тоже сделана попытка исследования роли бикарбоната в реакциях фотосистемы II. Результаты, представленные в настоящей работе, дают основание предполагать, что место связывания $HCO_3^-$ находится на акцепторной стороне фотосистемы II.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мембранные фрагменты фотосистемы II, солюбилизированные с помощью детергента Triton X-100 выделяли согласно BBY методике (Berthold et al., 1981) с некоторыми модификациями (Wölker et al., 1984). Конечный осадок полученных мембранных фрагментов ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 50 мМ MES-NaOH (pH 6,1), 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозы и 3 мМ $MgCl_2$, и хранили в жидком азоте.

Для обработки формиатом, мембраны фотосистемы II размораживали при температуре 2°C и промывали путем ресуспендирования в буферном растворе 50 мМ MES-NaOH (pH 6.1), 5 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, 300 мМ сахарозы и 1 мМ EDTA и центрифугирования при 30000×g в течение 20 мин. Далее осадок мембран промывали дважды с помощью ресуспендирования в том же буфере, дополнительно содержащем формиат натрия в разных концентрациях, начиная от 0,025 мМ до 500 мМ, и центрифугирования при 30000×g в течение 20 мин. С целью получения максимального значения мультилинейного сигнала электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) $S_2$ состояния (сигнал ML-$S_2$) перед последней промывкой к буферным растворам был добавлен 3% (v/v) метанол.

Конечный осадок мембран фотосистемы II, предназначенный для измерения спектров ЭПР, при концентрации хлорофилла (Хл), равной 20 мг/мл, переносили в кварцевые пробирки с внутренним диаметром 4 мм. Состояние $S_1$ фотосистемы II стабилизировали инкубированием образцов в темноте при температуре 4°C в течение одного часа. Мультилинейный сигнал $S_2$-состояния индуцировали освещением образцов

в течение 10 мин при температуре 200 K белым светом от лампы накаливания (500 Вт), пропущенным через тепловой фильтр.

Образцы, предназначенные для измерения выхода кислорода и флуоресценции, брали из конечного осадка мембран и ресуспендировали в буферных растворах, в которых проводилась последняя промывка препаратов (с исключением MeOH), до конечной концентрации Хл, равной 3 мг/мл, и хранили в жидком азоте.

Удаление $CO_2$ из буферной среды осуществляли двумя путями: либо продуванием среды воздухом, лишенным $CO_2$ (пропусканием воздуха через колонку, наполненную 40% раствором NaOH), либо кипячением и быстрым охлаждением раствора и последующим хранением его в герметичных условиях.

Измерения спектров ЭПР осуществляли на спектрометре Bruker ESR-300 (X-диапазон). Детали измерения ЭПР приводятся при описании экспериментальных результатов.

Величину и кинетику светоиндуцированных изменений флуоресценции и замедленного излучения Хл измеряли в однолучевом оптическом спектрометре, собранном в лабораторных условиях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

***Спектры ЭПР $S_2$-состояния.*** Известно, что освещение кислород-выделяющих мембран фотосистемы II при температуре 200 K приводит к образованию $S_2$-состояния, стабильного в условиях криогенных температур. Это состояние характеризуется сигналами ЭПР двух типов: мультилинейным сигналом с центром при g = 2.0 и широким синглетным сигналом с центром при g = 4.1 (Casey and Sauer, 1984; Dismukes and Siderer, 1981; Zimmermann and Rutherford, 1984). Спектры ЭПР $S_2$-состояния ФСII, полученные в присутствии разных концентраций ионов $HCO_2^-$, показаны на рис. 1. Представленные спектры состоят, по меньшей мере, из 18 хорошо разрешенных линий (*a-e*), приписываемых основному состоянию (S=1/2) тетрамера Mn. В образце, не содержащем MeOH, кроме сигнала ML-$S_2$ индуцировался сигнал при g = 4.1 (*e*), относящийся к спиновому состоянию 5/2 кластера Ca-4Mn. Образование сигнала с g = 4.1 кластера Ca-4Mn предотвращалось в присутствии MeOH (~3%) (*a*).

В образцах, обработанных формиатом вплоть до концентрации 10 мМ, не проявились видимые изменения в мультилинейном спектре $S_2$-состояния (*b*). Однако значительное ингибирование сигнала ML-$S_2$ происходило в образцах, обработанных высокими концентрациями (>10 мМ) формиата. На рис. 1 изображены спектры, полученные при концентрациях $HCO_2^-$, равных 100 (*c*) и 250 мМ (*d*), соответственно. Ингибирование сигнала ML-$S_2$ происходило значительно быстрее при концентрациях формиата между 10 мМ и 100 мМ и постепенно замедлялось при концентрациях $HCO_2^-$ выше, чем 100 мМ. В образцах, обработанных 250 и 500 мМ формиатом, интенсивности остаточного сигнала ML-$S_2$ были почти одинаковы и составляли приблизительно 25±15% от интенсивности сигнала, обнаруженного в контрольном препарате. В присутствии формиата не наблюдались изменения величины сверхтонкого расщепления в спектрах сигнала ML-$S_2$, что может свидетельствовать о возможной принадлежности остаточного сигнала к неингибированным центрам.

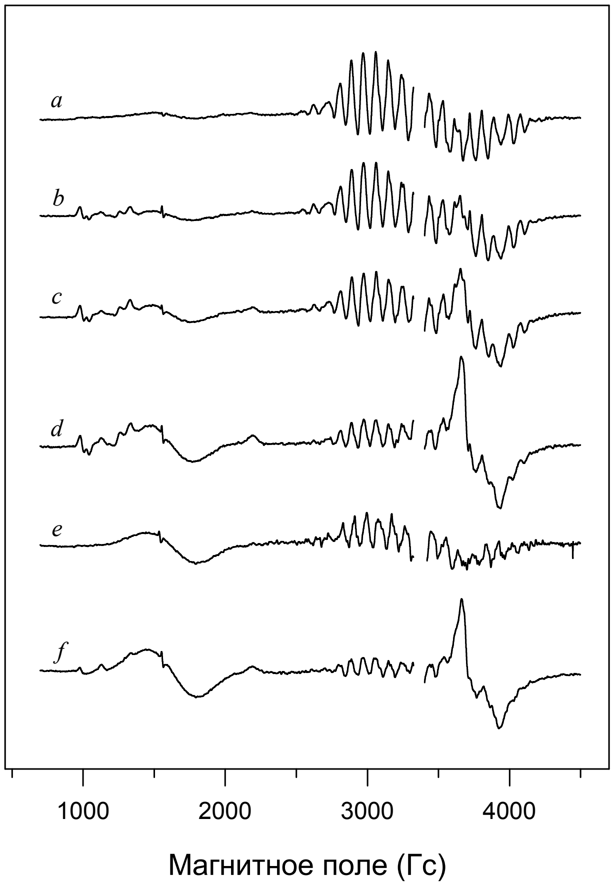



**Рис. 1.** Спектры ЭПР $S_2$-состояния ФСII в присутствии 10 мМ (*c*) и 250 мМ (*d*, *f*) формиата, в присутствии 3% метанола (*a-d*) и без метанола (*e*, *f*). Все спектры нормализованы в соответствии с сигналом радикала тирозина $Y_D^{\bullet}$ (измеренного при мощности микроволнового излучения 0,8 мкВт и модуляции амплитуды магнитного поля 3,2 Гс), являющимся внутренним стандартом ФСII. Параметры, установленные при измерении: частота и мощность микроволнового излучения 9,42 *г*Гц и 3,2 мВт, соответственно; амплитуда модуляции магнитного поля 10 Гс; температура 6 K.

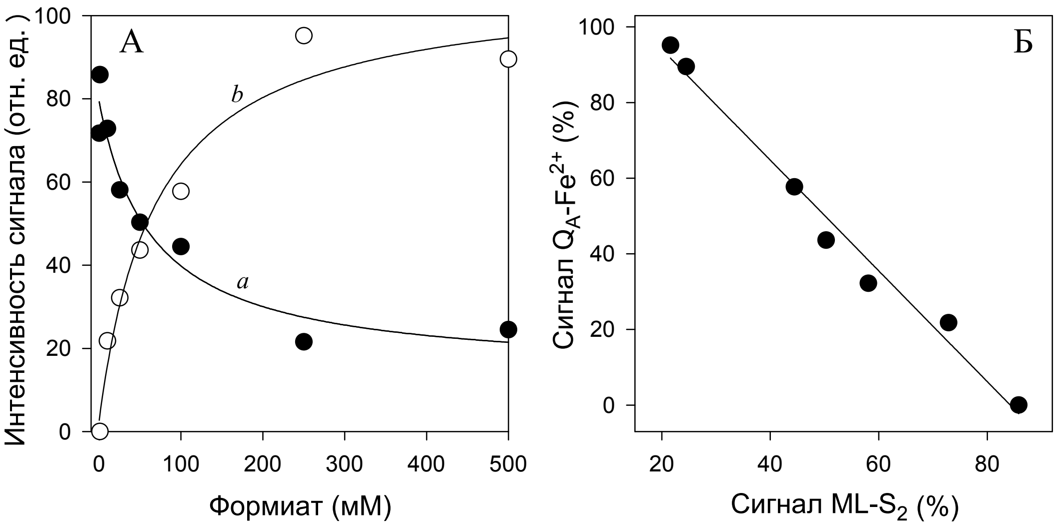



**Рис. 2.** (А) Зависимость интенсивности сигналов ЭПР ML-$S_2$ (*a*) и $Q_A^{\bullet-}Fe^{2+}$ (*b*) от концентрации ионов формиата в мембранах ФСII. (В) Корреляция снижения интенсивности сигнала ML-$S_2$ и роста интенсивности $HCO_2^-$-индуцированного сигнала $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$.

Второй сигнал $S_2$-состояния фотосистемы II, обнаруживаемый в позиции g = 4.1, постепенно возрастал с увеличением концентраций $HCO_2^-$. При концентрации формиата выше, чем 100 мМ, в присутствии 3% MeOH, в спектре (*d*) наблюдалось заметное увеличение интенсивности сигнала g = 4.1. При этом интенсивность сигнала g = 4.1 состояния $S_2$ была сравнима с интенсивностью этого же сигнала, обнаруженного в спектре контрольного образца (*e*) без MeOH. С ростом концентрации формиата вплоть до 250 мМ интенсивность сигнала g = 4.1 увеличивалась, в то же время, как отмечалось выше, интенсивность сигнала ML-$S_2$ уменьшалась. Следует отметить, что действие ионов формиата на сигнал ML-$S_2$ исчезало после промывания формиат-обработанных мембран буферным раствором, несодержащем ионы $HCO_2^-$.

***Спектры ЭПР комплекса $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$.*** В фотосистеме II в присутствии формиата под действием света индуцируется сигнал ЭПР при g = 1.82, приписываемый восстановленному состоянию акцепторного комплекса $Q_A$-$Fe^{2+}$ ($Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$) (Vermaas and Rutherford, 1984; Rutherford and Zimmermann, 1984). В экспериментах, проведенных нами, в контрольных образцах при мощностях микроволнового излучения 3,2 мВт сигнал $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$ в области g = 1.82 не обнаруживался. Однако в формиат-обработанных препаратах (при концентрации $HCO_2^-$ больше, чем 10 мМ), освещенных при температуре 200 K, сигнал $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$ получал развитие и его рост сопутствовал уменьшению интенсивности мультилинейного сигнала $S_2$-состояния (Рис. 1, *c*, *d*). Сигнал ЭПР комплекса $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$ возрастал с увеличением концентрации $HCO_2^-$ и достигал насыщения при концентрации 250 мМ.

Зависимость уменьшения интенсивности сигнала ML-$S_2$ и увеличения сигнала $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$ от концентрации формиата показаны на рис. 2 (панель А), который демонстрирует стехиометричную пропорциональность их зависимостей от концентрации формиата (панель В). Такая корреляция сигналов EPR (сигналы ML-$S_2$ и $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$) может указывать на то, что ионы $HCO_2^-$ замедляют перенос электрона в донорной и акцепторной частях фотосистемы II.

***Сигнал ЭПР тирозина $Y_Z^{\bullet}$.*** Сигнал окисленного тирозина $Y_Z^{\bullet}$ измеряли при температуре 77 K. Радикал тирозина $Y_Z^{\bullet}$ был захвачен освещением формиат-обработанных образцов при температуре 253 K в течение 1 мин и быстрым замораживанием их в жидком азоте (Kodera et al., 1995). На рис. 3 демонстрируется появление сигнала EPR радикала тирозина $Y_Z^{\bullet}$, захваченного во время освещения образца в присутствии 250 мМ формиата. Спектр *a* показывает сигнал тирозина $Y_D^{\bullet}$, зарегистрированный в образцах, инкубированных в темноте, в то время как спектр *b* представляет свето-индуцированный сигнал, в котором радикалы тирозина $Y_D^{\bullet}$ и $Y_Z^{\bullet}$ были зарегистрированы вместе. Разностный спектр (*c*) соответствует сигналу окисленного тирозина $Y_Z^{\bullet}$, который может свидетельствовать о замедлении донирования электрона от кластера Ca-$(Mn)_4$ в присутствии ионов формиата. Интенсивность сигнала радикала $Y_Z^{\bullet}$, захваченного освещением, составляла приблизительно 50% от сигнала окисленного тирозина $Y_D^{\bullet}$, что количественно почти составляет стехиометрию с уменьшением интенсивности мультилинейного сигнала $S_2$ состояния.

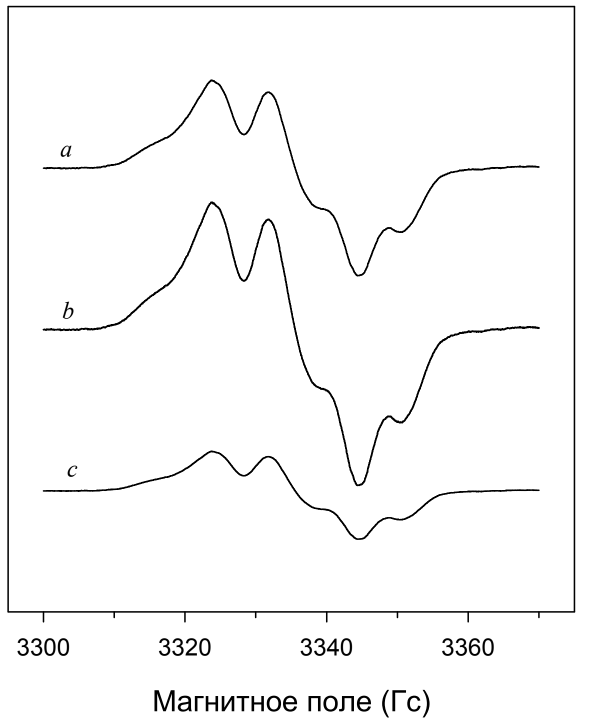



**Рис. 3.** Индуцирование сигнала ЭПР тирозина $Y_Z^{\bullet}$ в препаратах ФСII в присутствии 250 мМ формиата при pH 6,0. Освещение в течение 1 мин при температуре 253 K и быстрое замораживание образца (*b*) вызывают индукцию сигнала $Y_Z^{\bullet}$ (*c*), имеющего интенсивность, равную ~50% от сигнала $Y_D^{\bullet}$ (*a*). Параметры, установленные при измерении: частота и мощность микроволнового излучения 9,32 *г*Гц и 12,5 мкВт, соответственно; амплитуда модуляции магнитного поля 3,2 Гс; температура 77 K.

***Выделение кислорода фотосистемой II.*** Мембраны ФСII, обработанные формиатом по схеме, аналогичной использованной для приготовления образцов для проведения измерения ЭПР, ресуспендировали в таком же буфере, использованном для обработки, после чего проводили измерения выхода кислорода. Полученные результаты продемонстрированы на рис. 4, который свидетельствует о том, что ионы $HCO_2^-$ при концентрациях меньше, чем 1 мМ, не вызывали заметного изменения в скорости выделения $O_2$ (кривая *a*). Эффективное ингибирование $O_2$-выделяющей активности ФСII проявлялось при концентрациях формиата больше, чем 5 мМ, а 50%-е ингибирование достигалось в присутствии 40-50 мМ формиата. Такое резкое ингибирование происходило вплоть до концентрации $HCO_2^-$ равной 100 мМ, после чего, в пределах концентрации формиата 100-500 мМ, следовало медленное уменьшение выхода $O_2$ вплоть до 20%. Эти результаты находятся в согласии с данными, полученными при измерении ингибирования сигнала ML-$S_2$ и образования сигнала $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$.

Ингибирующее действие ионов $HCO_2^-$ на выход кислорода тоже имело обратимый характер. После промывания препаратов ФСII, подвергнутых обработке ионами $HCO_2^-$, в среде не содержащей формиат, выделение кислорода восстанавливалось почти полностью до значения более чем 90% (кривая *b*) величины выделения $O_2$, свойственного контрольному образцу. Ссылаясь на эти результаты, можно заключить, что ингибирование выделения кислорода может быть вызвано замедлением переноса электрона из-за связывания формиата с ФСII, равновероятно, в ее донорной или акцепторной сторонах.

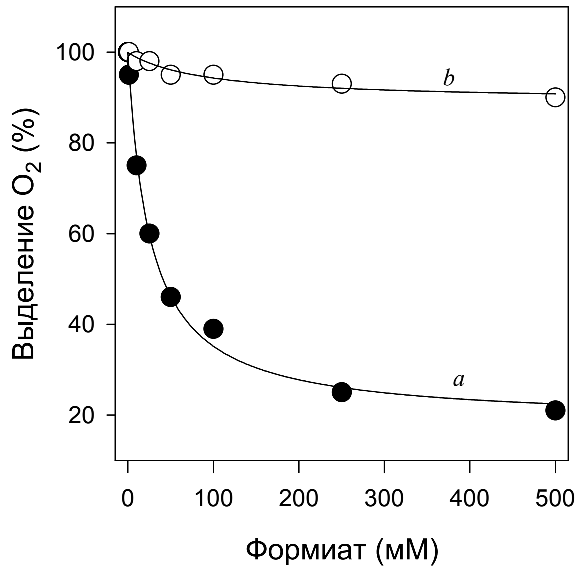



**Рис. 4.** Зависимость выхода $O_2$ от концентрации формиата в препаратах ФСII. После обработки мембраны ресуспендировались в тех же буферных растворах, которые содержали различные концентрации формиата (*a*) и в буфере, не содержащем формиат (*b*). Среда измерения содержала 50 мМ MES-NaOH (pH 6,1), 300 мМ сахарозы, 5 мМ NaCl, 5 мМ $CaCl_2$, 1мМ EDTA и 3% MeOH. В качестве акцептора электрона использовался P*p*BQ (200 мкМ, растворенный в DMSO). У контрольных образцов скорость выделения $O_2$ была равна 400±20 мкМоль $O_2$(мг Хл)$^{-1}$ч$^{-1}$. Измерения проводили при температуре 25°C при непрерывном освещении насыщающим светом, пропущенным через стеклянный светофильтр R50 (λ>650 нм, Toshiba).

***Выход свето-индуцированной флуоресценции хлорофилла.*** Изменение окислительно-восстановительного состояния электронных кофакторов (например Pheo или $Q_A$) фотосистемы II вызывает изменение квантового выхода флуоресценции хлорофилла (Рис. 5, *a*) от уровня $F_0$ (когда $Q_A$ не заряжена), называемой "быстрой" или "постоянной" флуоресценцией, до максимального уровня $F_M$ (когда происходит свето-индуцированное или химическое восстановление $Q_A$).

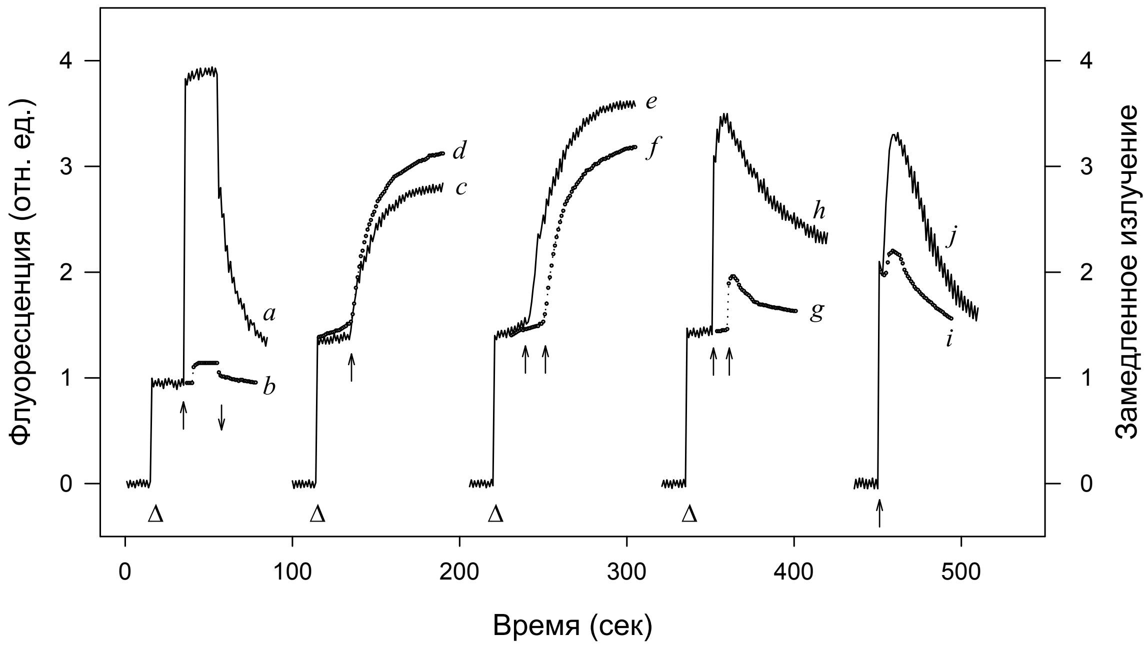



**Рис. 5.** Действие бикарбоната и формиата на выход флуоресценции Хл (*a-h*) и замедленное излучение света (*i, j*) у необработанных (*a, c*) и лишенных кластера Ca-$(Mn)_4$ (*b, g-j*) препаратов ФСII в отсутствие (*c*) и в присутствии 5 мМ $HCO_3^-$ (*d*), в присутствии 20 мМ $HCO_2^-$ (*e*) и 20 мМ $HCO_2^-$ плюс 5 мМ $HCO_3^-$ (*f*), в присутствии 4 Mn/РЦ (*g, i*) и 4 Mn/РЦ плюс 5 мМ $HCO_3^-$ (*h, j*), измеренных при значении pH 6,3. Для возбуждения флуоресценции был использован слабый (0,05 Вт/м$^2$) измерительный свет с длиной волны λ=490 нм. Интенсивность действующего (λ>650 нм) света, вызывающего фотохимическую реакцию в ФСII, была равна 200 Вт/м$^2$ (1, 2, 7-10) и 50 Вт/м$^2$ (*c-f*). Концентрация Хл равна 10 мкг/мл. Δ – включение измерительного света; ↑(↓) – включение (выключение) действующего света.

При измерении выхода флуоресценции и замедленного излучения Хл малый объем мембран ФСII промывали ресуспендированием в $HCO_3^-$-обедненном буферном растворе (50 мМ MES-NaOH (pH 6,1) и 35 мМ NaCl) и центрифугированием при 30000×g в течение 20 мин. Осадок мембран вновь ресуспендировали в том же буферном растворе до конечной концентрации Хл, равной 3 мг/мл, и выдерживали в темноте на льду в герметичном сосуде. Непосредственно перед измерением 10 мкл суспензии мембран ФСII разбавляли до 3 мл добавлением измерительной среды (конечная концентрация Хл была равна 10 мкг/мл), содержащей либо $HCO_2^-$ и $HCO_3^-$ (в отдельности или совместно), либо обедненной $HCO_3^-$ (контроль).

Изменения выхода флуоресценции Хл, вызванные восстановлением пластохинона $Q_A$ в результате свето-индуцированного переноса электрона в фотосистеме II, в присутствии и в отсутствие ионов $HCO_3^-$ или $HCO_2^-$, показаны на рис. 5. Добавление экзогенного $HCO_3^-$ (5 мМ) к мембранам ФСII, предварительно очищенным от ионов бикарбоната, приводило к увеличению переменной флуоресценции Хл (*c, d*). В присутствии ионов $HCO_2^-$ (20 мМ) также происходило увеличение переменной флуоресценции Хл таким же образом (*e*), как это происходило в присутствии ионов $HCO_3^-$. При этом слабое увеличение флуоресценции происходило также на уровне $F_0$ под действием слабого измерительного света (*e*). Такое поведение выхода флуоресценции Хл в присутствии ионов $HCO_2^-$ или $HCO_3^-$ свидетельствует о действии этих ионов через акцепторную цепь фотосистемы II. Однако при этом совместное добавление $HCO_2^-$ (20 мМ) и $HCO_3^-$ (5 мМ) не выявляло аддитивного действия. Напротив, добавление 5 мМ $HCO_3^-$ в присутствии 20 мМ $HCO_2^-$ снижало выход переменной флуоресценции Хл почти до уровня, наблюдаемого в присутствии только одного $HCO_3^-$ (*f*), что свидетельствует о вытеснении ионов $HCO_2^-$ из места связывания значительно малыми концентрациями ионов бикарбоната.

Действие ионов $HCO_2^-$ и $HCO_3^-$ в отдельности и их совместное действие на выход переменной флуоресценции Хл было исследовано в диапазоне значений pH между 5,9 и 7,5 и демонстрируется на рис. 6. Как показывают эти полученные зависимости, значительное действие добавленных $HCO_2^-$ и $HCO_3^-$ на переменную флуоресценцию Хл наблюдалось при значениях pH<7,0 ($HCO_3^-$-обедненный буферный раствор), в то время как при значениях pH>7,0 ($HCO_3^-$-обогащенный буферный раствор) существенных воздействий экзогенного $HCO_3^-$ и

$HCO_2^-$ обнаружено не было.

В мембранах фотосистемы II, лишенных кластера Ca-$(Mn)_4$, обратное восстановление переноса электрона с помощью экзогенного Mn требует также присутствия ионов $HCO_3^-$. В $HCO_3^-$-обедненной среде или в среде со значением pH < 6.5 перенос электрона в ФСII, исследуемый с помощью измерения переменной флуоресценции Хл, восстанавливался при добавлении 3-5 $Mn^{2+}$/РЦ в присутствии 5 мМ $HCO_3^-$ (*g*), о чем неоднократно сообщалось в различных публикациях (Klimov et al., 1995a; 1995b; 1997) и что интерпретировалось как участие бикарбоната в облегчении связывания $Mn^{2+}$ и переноса электрона на донорной стороне. Надо отметить, что такого роста переменной флуоресценции Хл не происходило в присутствии ионов $HCO_2^-$ и $Mn^{2+}$, что еще раз указывает на наличие формиат-зависимого участка ингибирования в донорной части фотосистемы II.

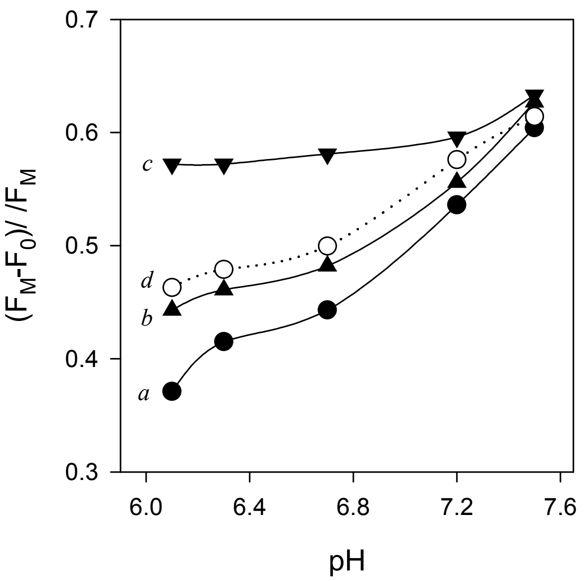



**Рис. 6.** Зависимость активности ФСII от значения pH среды в отсутствие (*a*), в присутствии 5 мМ $HCO_3^-$ (*b, d*) и в присутствии 20 мМ $HCO_2^-$ (*c, d*).

***Замедленное излучение хлорофилла.*** В работе также было исследовано замедленное излучение (ЗИ) света, испускаемого хлорофиллом ФСII в результате рекомбинации ион-радикальной пары [$P_{680}^{\bullet+}Q_A^{\bullet-}$]. Интенсивность и кинетика этого свечения в нативной ФСII во многом определяется реакциями равновесия на ее донорной и акцепторной стороне. Отметим, что интенсивность замедленного излучения Хл высока, когда ФСII перед действием возбуждающего света находится в состоянии $P_{680}Q_A$ (обычно установленное в темноте), в то время как состояние $P_{680}^{\bullet+}Q_A$ или $P_{680}Q_A^{\bullet-}$ не является благоприятным для индукции этого свечения. Другими словами, для индукции высокого выхода замедленного излучения Хл требуется эффективный механизм, обеспечивающий быстрое донирование на $P_{680}^{\bullet+}$ и окисление пластохинона $Q_A^{\bullet-}$.

В мембранах фотосистемы II, лишенных кластера Ca-4Mn, в отсутствие бикарбоната экзогенный $Mn^{2+}$ (1-8 $Mn^{2+}$/РЦ) вызывал несущественное изменение интенсивности замедленного излучения (Рис. 5, *i*), что может свидетельствовать или о слабом донировании электрона на $P_{680}^{\bullet+}$ (накопление $P_{680}^{\bullet+}Q_A$), или о сильном донировании и накоплении состояния $P_{680}Q_A^{\bullet-}$ в реакционных центрах. Однако, как становится ясным из вышесказанного, добавление только одного $Mn^{2+}$ не способствует переносу электрона в ФСII с высокой интенсивностью, что отражается на величине переменной флуоресценции Хл, которая, в свою очередь, связана с накоплением состояния $P_{680}Q_A^{\bullet-}$ в реакционных центрах. Однако в присутствии ионов $HCO_3^-$ (5 мМ), добавленных вместе с экзогенным $Mn^{2+}$, наблюдалось значительное увеличение интенсивности замедленного излучения Хл (Рис. 5, *j*), что может объясняться блокированием цепи переноса электрона на уровне $Q_A^{\bullet-}$, вызывающем быстрый возврат электрона от $Q_A^{\bullet-}$ на $P_{680}^{\bullet+}$ и регенерацию состояния $P_{680}Q_A$ в РЦ, что, в свою очередь, является благоприятным состоянием для возникновения замедленного излучения ХЛ с высокой интенсивностью.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значение бикарбоната для активности фотосистемы II интенсивно обсуждалось в ранних исследованиях (Blubaugh and Govindjee, 1988; Govindjee and van Rensen, 1978; 1993; Stemler, 1980; 1982; Stemler et al., 1974; Stemler and Govindjee, 1973; van Rensen et al., 1999), и даже была предложена модель окисления воды, включающая $HCO_3^-$ в качестве медиатора (Metzner, 1978). Позднее было показано, что акцепторная сторона ФСII отвечает за связывание и функции $HCO_3^-$ (Blubaugh and Govindjee, 1988b; Govindjee and van Rensen, 1978; 1993; Jursinic and Stemler, 1982; Jursinic et al., 1976; Stemler, 1982; van Rensen et al., 1999; Wydrzynski and Govindjee, 1975). Было сделано предположение, что бикарбонат является одним из лигандов негемового железа (Deligiannakis et al., 1994; Diner and Petrouleas, 1990; Petrouleas and Diner,1990; Hienerwadel and Berthomieu, 1995; Jursinic and Stemler, 1984; Petrouleas et al., 1994; Stemler and Jursinic, 1993) и что нормальный перенос электрона от $Q_A^{\bullet-}$ на $Q_B$ требует

именно связывания аниона $HCO_3^-$ с негемовым Fe. Предпологалось, что местом связывания формиата может являться негемовое Fe, расположенное между акцепторами электрона $Q_A$ и $Q_B$, и его ингибирующий эффект в фотосистеме II состоит в конкурентном вытеснении $HCO_3^-$ из места его связывания.

В исследованиях середины 1990-х годов было показано, что ингибирование переноса электрона на донорной стороне ФСII требует более низкой (меньше, чем в 1000 раз) концентрации формиата (Klimov et al., 1995a; 1995b), чем на ее акцепторной стороне (Deligiannakis et al., 1994; Petrouleas et al., 1994). Было высказано мнение, что бикарбонат, возможно, участвует в образовании функционального кластера Ca-4Mn или лигандируется и участвует в регуляции редокс свойств кластера Ca-4Mn (Baranov et al., 2004; Dasgupta et al., 2004; Dismukes et al., 2001; Klimov et al., 1995a; 1995b; 1997). Другими исследователями (Stemler and Lavergne, 1997) тоже было показано, что антагонист бикарбоната – формиат также может модифицировать стабильное в темноте $S_1$-состояние ФСII, что может вызывать накопление состояния $S_0$ с необычно высоким выходом.

Таким образом, разными группами исследователей в общей сложности были предложены два основных, и в то же время противоположных участка связывания бикарбоната, которые регулируют функции фотосистемы II. Ими являются, с одной стороны, акцепторная сторона, и с другой, донорная сторона ФСII (вероятно, кластер Ca-4Mn или его близкое окружение).

Основные результаты, полученные в нашей работе, могут суммироваться следующим образом: 1) ингибирование образования мультилинейного сигнала $S_2$-состояния и выделения кислорода формиатом; 2) световая индукция радикала тирозина $Y_Z^{\bullet}$ в присутствии формиата; 3) образование сигнала ЭПР в области g = 1.82, свойственной восстановленному акцепторному комплексу $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$; 4) рост выхода переменной флуоресценции Хл в присутствии экзогенных ионов $HCO_3^-$ и $HCO_2^-$; 5) увеличение амплитуды миллисекундной компоненты замедленного излучения Хл в присутствии ионов $HCO_3^-$.

Необходимо отметить, что в использованных нами препаратах не было найдено изменений интенсивности сигнала ML-$S_2$, выхода кислорода и переменной флуоресценции Хл при низких концентрациях ионов формиата (<1 мМ), что противоречит результатам (Klimov et al., 1995a; 1995b), утверждаещим эффективное действие низких концентраций ионов $HCO_2^-$ (<1 мМ) на перенос электрона на донорном участке фотосистемы II.

Представленные нами данные позволяют по-другому интерпретировать функцию бикарбоната в фотосистеме II. Более вероятным объяснением полученных данных может явиться модель, включающая один участок связывания бикарбоната и два участка связывания формиата (один из которых является местом конкуренции с бикарбонатом) в фотосистеме II.

Первым участком связывания формиата, и участком связывания бикарбоната в фотосистеме II является электрон-акцепторный комплекс $Q_A$-$Fe^{2+}$. Это связывание является конкурентным, причем аффинность связывания ионов $HCO_3^-$ значительно выше, чем у ионов $HCO_2^-$, что подтверждается тем фактом, что при измерении переменной флуоресценции Хл формиат был вытеснен из места связывания более низкими концентрациями ионов бикарбоната. Одним из объяснений полученных нами результатов ингибирования сигнала ML-$S_2$ и выделения кислорода при высоких концентрациях $HCO_2^-$ может являться именно связывание формиата и замещение его в акцепторной стороне ФСII бикарбонатом. Это может найти подтверждение в обнаруженных нами фактах, свидетельствующих о том, что концентрации ионов формиата (10-100 мМ), требуемые для ингибирования мультилинейного сигнала $S_2$-состояния и выделения кислорода, сравнимы с концентрациями ионов формиата, необходимыми для замедления переноса электрона между $Q_A^{\bullet-}$ и $Q_B$, найденного ранее (Deligiannakis et al., 1994; Diner and Petrouleas, 1990; Jursinic and Stemler, 1982; 1984; 1986; Petrouleas et al., 1994; Petrouleas and Diner, 1990). Редокс состояние комплекса $Q_A$-$Fe^{2+}$ является одним из ключевых в переходах S-цикла ФСII, и поэтому изменение его свойств может иметь значительное влияние на распределение S-состояний. Свидетельством этого может стать линейное соотношение, полученное между увеличением сигнала $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$ и уменьшением интенсивности мультилинейного сигнала $S_2$-состояния.

Исследования мутаций аминокислот в белках $D_1$ и $D_2$, находящихся в близком окружении $Q_A$-$Fe^{2+}$-$Q_B$, проведенные на зеленых водорослях *C. reinhardtii* и цианобактериях *Synechocystis* sp. PCC 6714, тоже выявили конкуренцию $HCO_2^-$/$HCO_3^-$ на акцепторной стороне фотосистемы II (Cao et al., 1991; Govindjee et al., 1991; Vernotte et al., 1995). Ингибирование переноса электрона в донорной части ФСII в зависимости от изменения ее акцепторной стороны было показано также исследованиями, проведенными на $D_1$ мутантах *C. reinhardtii* (Xiong et al., 1998), у которых с помощью точечной мутации аргинин был замещен глутаматом (мутант $D_1$-$R^{257}$E) или

метионином (мутант $D_1$-$R^{257}M$). Результаты этих исследований показали низкую чувствительность полученных мутантов к формиату, определенную на основе измерения кинетики флуоресценции Хл, а также значительно низкую скорость выделения ими кислорода, что вкупе свидетельствует об ответственности акцепторной стороны ФСII в процессе конкуренции $HCO_3^-$ /$HCO_2^-$ в упомянутых объектах исследования.

Однако, как показано в представленных нами экспериментальных данных, формиат напрямую может взаимодействовать также с компонентами донорного участка ФСII, возможно, на уровне кластера Ca-4Mn или тирозина $Y_Z$. Подтверждением этого может явиться ингибирование выделения $O_2$ фотосистемой II, сигнала ML-$S_2$ и образование радикала тирозина $Y_Z^{\bullet}$ в присутствии формиата, который, возможно, ингибирует перенос электрона от кластера Ca-4Mn на тирозин $Y_Z^{\bullet}$. Индуцирование сигнала окисленного тирозина $Y_Z^{\bullet}$ показывает, что перенос электрона от кластера Ca-4Mn на тирозин $Y_Z^{\bullet}$, возможно, замедляется в $S_2$ состоянии. Уменьшение интенсивности сигнала ML-$S_2$ может происходить из-за привязывания формиата к участку близкому к кластеру Ca-4Mn, или напрямую к самому кластеру. Это может найти подтверждение в появлении сигнала g = 4.1 в присутствии ионов формиата (Рис. 1, спектры *c* и *d*) и увеличении его интенсивности с ростом концентрации $HCO_2^-$, что является предпосылкой для вывода о вытеснении MeOH, связанного с кластером Ca-4Mn, формиатом (Force et al., 1998), и тем самым связывания ионов $HCO_2^-$ с кластером Ca-4Mn. При такой версии линейное соотношение, найденное между ростом сигнала $Q_A^{\bullet-}$-$Fe^{2+}$ и уменьшением интенсивности мультилинейного сигнала $S_2$-состояния, действительно может отражать тот факт, что константа связывания ионов формиата может оказаться почти одинаковой для донорной и акцепторной части фотосистемы II. Однако, по всей видимости, этот участок связывания ионов формиата происходит вне конкуренции с бикарбонатом, поскольку добавление ионов $HCO_3^-$ (вплоть до 10 мМ) никак не влияло на ингибирующее действие $HCO_2^-$, обнаруженное в сигнале ML-$S_2$ (данные не показаны).

Что касается наличия высокоаффинного участка связывания ионов $HCO_3^-$ на донорной стороне фотосистемы II, показанного в работах (Allakhverdiev et al., 1997; Baranov et al., 2004; Dismukes et al., 2001; Klimov et al., 1995a; 1995b; 1997; Wincencjusz et al., 1996) и являющегося основой для нового толкования роли бикарбоната в кислород-выделяющих фотосинтезирующих организмах, то, на наш взгляд, оно является несостоятельным. Действительно, если учитывать, что в $HCO_3^-$-обедненной буферной среде все еще может присутствовать 3-5% бикарбоната, то при наличии высокоаффинного участка связывания может оказаться необъяснимым факт усиления переноса электрона на донорной стороне ФСII с помощью экзогенного $HCO_3^-$.

Необходимо отметить, что в моделях, рассматривающих $Q_A$-$Fe^{2+}$ как место связывания $HCO_3^-$, учитывалось, что фотосистема II осуществляет нормальный перенос электрона между $Q_A^{\bullet-}$ и $Q_B$ в присутствии ионов $HCO_3^-$, в то время как при его замещении ионами формиата перенос электрона на акцепторной стороне фотосистемы II (между пластохинонами $Q_A^{\bullet-}$ и $Q_B$) замедляется. Однако, при таком рассмотрении проблемы, неясным остается факт, почему присутствие бикарбоната ускоряет перенос электрона в фотосистеме II между акцепторами электрона $Q_A^{\bullet-}$ и $Q_B$, в то время как формиат, имеющий химическую структуру, близкую бикарбонату, замедляет этот процесс на том же участке цепи переноса электрона.

Полученные экспериментальные результаты и их анализ позволили нам предложить новое суждение о механизме участия бикарбоната в переносе электрона на акцепторной стороне фотосистемы II: наличие бикарбоната, связанного с акцепторной стороной ФСII, не ускоряет, а наоборот, так же как и формиат, замедляет перенос электрона между акцепторами электрона $Q_A^{\bullet-}$ и $Q_B$, в то время как отсутствие ионов $HCO_3^-$ или $HCO_2^-$ сопровождается быстрым уходом электрона от $Q_A^{\bullet-}$ на пластохинон $Q_B$. Согласно данной интерпретации, относительно низкий выход переменной флуоресценции Хл, обнаруженный в отсутствие ионов бикарбоната или формиата, объясняется довольно облегченным уходом электрона от пластохинона $Q_A^{\bullet-}$ на пластохинон $Q_B$ и далее. Таким же образом объясняется и очень низкий выход переменной флуоресценции Хл, регистрируемый в лишенных кластера Ca-4Mn мембранах ФСII в присутствии экзогенного $Mn^{2+}$, но в отсутствие ионов $HCO_3^-$. Низкая интенсивность замедленного излучения Хл в присутствии экзогенного $Mn^{2+}$ при этом объясняется преобладением неактивного состояния $P_{680}^{\bullet+}Q_A$ в фотосистеме II из-за быстрого ухода электрона и недостаточного накопления пластохинона $Q_A^{\bullet-}$ в отсутствие $HCO_3^-$.

В присутствии ионов $HCO_3^-$, также как и ионов $HCO_2^-$ перенос электрона замедляется на уровне пластохинона $Q_A^{\bullet-}$, в результате чего в интактных мембранах ФСII растет выход переменной флуоресценции хлорофилла. В присутствии ионов $HCO_3^-$ такое явление наблюдается и в мембранах, лишенных кластера Ca-4Mn (так

же как и в присутствии экзогенного $Mn^{2+}$). При измерении замедленного излучения Хл в препаратах, лишенных кластера Ca-4Mn, в присутствии ионов $HCO_3^-$ электрон, задержанный в пластохиноне $Q_A^{•-}$ рекомбинирует с $P_{680}^{•+}$ и вызывает образование состояния $P_{680}Q_A$, являющегося активным для индукции свечения Хл с высоким выходом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении следует уместным отметить тот факт, что недавно проведенные исследования (Aoyama et al., 2008; Clausen et al., 2005; Hillier et al., 2006; Shevela et al., 2007; Ulas et al., 2008) также подтвердили, что кластер Ca-4Mn не может являться местом связывания бикарбоната в фотосистеме II, а сам бикарбонат не является субстратом для выделения молекулярного кислорода (Clausen et al., 2005). Более прямые подтверждения этого факта получены недавно (Shen et al., 2010) по результатам рентгеноструктурного анализа кристаллов фотосистемы II. Так как, указанные исследования проведены при разрешении < 2Å, позволяющем различать атомы в кластере Ca-4Mn, молекулы бикарбоната в нем не выявлены. Эти факты четко свидетельствует о функции бикарбоната в переносе электрона в акцепторной части ФСII, на участке $Q_A$-$Fe^{2+}$-$Q_B$. Результаты настоящей работы свидетельствуют о замедлении переноса электрона на участке $Q_A$-$Fe^{2+}$-$Q_B$ при связывании бикарбоната. Поэтому считаем необходимым отметить, что в будущих исследованиях роли бикарбоната в переносе электрона дожна быть учтена специфика его участия в реакциях на акцепторной стороне фотосистемы II.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Значительная часть экспериментов проводилась в лаборатории ЭПР в университете Квансей Гакуин, Япония. Поэтому считаю своим долгом выразить искреннюю благодарность руководителю лаборатории, профессору А. Кавамори за оказанную ею материальную и теоретическую поддержку во время выполнения работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

**Allakhverdiev S.I., Yruela I., Picorel R., Klimov V.V.** (1997) Bicarbonate is an essential constituent of the water-oxidizing complex of photosystem II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94:** 5050-5054.

**Aoyama C., Suzuki H., Sugiura M., Noguchi T.** (2008) Flash-induced FTIR difference spectroscopy shows no evidence for the structural coupling of bicarbonate to the oxygen-evolving Mn cluster in photosystem II. Biochemistry **47:** 2760-2765.

**Baranov S.V., Tyryshkin A.M., Katz D., Dismukes G.C., Ananyev G.M., Klimov V.V.** (2004) Bicarbonate is a *native* cofactor for assembly of the manganese cluster of the photosynthetic water oxidizing complex: Kinetics of reconstitution of $O_2$ evolution by photoactivation. Biochemistry **43:** 2070-2079.

**Barber J.** (2003) Photosystem II: The engine of life. Quart. Rev. Biophys. **36:** 71-89.

**Barber J.** (2006) Photosystem II: An enzyme of global significance. Biochem. Soc. Trans. 34: 619-631.

**Berthold D. A., Babcock G. T., Yocum C. F.** (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. FEBS Lett. **134:** 231-234.

**Blubaugh D.J., Govindjee** (1988) The molecular mechanism of the bicarbonate effect at the plastoquinone reductase of photosystem II. Photosynth. Res. **19:** 85-128.

**Cao J., Vermaas W.F.J., Govindjee** (1991) Arginine residues in the D2 polypeptide may stabilize bicarbonate binding in photosystem II of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta **1059:** 171-180.

**Casey J.L., Sauer K.** (1984) EPR detection of a cryogenically photogenerated intermediate in photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta **767:** 21-28.

**Clausen J., Beckman K., Junge W., Messinger J.** (2005) Evidence that bicarbonate is not the substrate in photosynthetic oxygen evolution. Plant Physiol. **139:** 1444-1450.

**Dasgupta J., van Willigen R.T., Dismukes G.C.** (2004) Consequence of structural and biophysical studies for the molecular mechanisms of photosynthetic oxygen evolution: Functional roles for calcium and bicarbonate. Phys. Chem. Chem. Phys. **6:** 4793-4802.

**Debus R.J.** (1992) The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta **1102:** 269-352.

**Deligiannakis Y., Petrouleas V., Diner B.A.** (1994) Binding of carboxylate anions at the non-heme Fe(II) of PSII. I. Effects on the $Q_A$-$Fe^{2+}$ and $Q_AFe^{3+}$ EPR spectra and the redox properties of the iron. Biochim. Biophys. Acta **1188:** 260-270.

**Diner B.A., Babcock G.T.** (1996) Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in

photosystem II. Ort D.R., Yocum, C.F. (Eds.) Oxygenic photosynthesis: The light reactions. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 213-247.

**Diner B.A., Petrouleas V.** (1990) Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of the photosystem II reaction center. II. Evidence that $HCO_3^-/CO_2$ binds to the acceptor-side non-heme iron. Biochim. Biophys. Acta **1015:** 141-149.

**Dismukes G.C., Klimov V.V., Baranov S.V., Kozlov Y.N., DasGupta J., Tyryshkin A.** (2001) The origin of atmospheric oxygen on earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98:** 2170-2175.

**Dismukes G.C., Siderer Y.** (1981) Intermediates of a polynuclear manganese center involved in photosynthetic oxidation of water. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78:** 274-278.

**Eaton-Rye J.J., Govindjee** (1988a) Electron transfer through the quinone acceptor complex of photosystem II in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes as a function of actinic flash number and frequency. Biochim. Biophys. Acta **935:** 237-247.

**Eaton-Rye J.J., Govindjee** (1988b) Electron transfer through the quinone acceptor complex of photosystem II after one or two actinic flashes in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes. Biochim. Biophys. Acta **935:** 248-257.

**Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaou K., Barber J., Iwata S.** (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. Science **303:** 1831-1838.

**Feyziev Y.M., Yoneda D., Yoshii T., Katsuta N., Kawamori A., Watanabe Y.** (2000) Formate-induced inhibition of the water-oxidizing complex of photosystem II studied by EPR. Biochemistry **39:** 3848-3855.

**Force D.A., Randall D.W., Lorigan G.A., Britt R.D.** (1998) ESEEM studies of alcohol binding to the manganese cluster of the oxygen evolving complex of Photosystem II. J. Am. Chem. Soc. **120:** 13321-13333.

**Govindjee, Schwarz B., Rochaix J.-D., Strasser R.J.** (1991) The herbicide-resistant D1 mutant L275F of *Chlamydomonas reinhardtii* fails to show the bicarbonate-reversible formate effect on chlorophyll *a* fluorescence transients. Photosynth. Res. **27:** 199-208.

**Govindjee, van Rensen J.J.S.** (1978) Bicarbonate effects on the electron flow in isolated broken chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta **505:** 183-213.

**Govindjee, van Rensen J.J.S.** (1993) Photosystem II reaction centre and bicarbonate. Deisenhofer J., Norris J.R. (Eds.) Photosynthetic Reaction Center, Vol.1. San Diego: Academic Press, Inc., 357-389.

**Hienerwadel R., Berthomieu C.** (1995) Bicarbonate binding to the non-heme iron of photosystem II, investigated by Fourier transform infrared difference spectroscopy and $^{13}C$ labeled bicarbonate. Biochemistry, **34:** 16288-16297.

**Hillier W., McConnell I., Badger M.R., Boussac A., Klimov V.V., Dismukes G.C., Wydrzynski T.** (2006) Quantitative assessment of intrinsic carbonic anhydrase activity and the capacity for bicarbonate oxidation in photosystem II. Biochemistry **45:** 2094-2102.

**Jursinic P., Stemler A.** (1982) A second range component of the reoxidation of the primary photosystem II acceptor, Q: Effects of bicarbonate depletion in chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta **681:** 419-428.

**Jursinic P., Stemler A.** (1984) Effect of bicarbonate depletion on secondary acceptors of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **764:** 170-178.

**Jursinic P., Stemler A.** (1986) Correlation between the binding of formate and decreased rates of charge transfer through the photosystem II quinones. Photochem. Photobiol. **43:** 205-212.

**Kamiya N., Shen J.-R.** (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100:** 98-103.

**Klimov V.V., Allakhverdiev S.I., Baranov S.V, Feyziev Ya.M.** (1995a) Effects of bicarbonate and formate on the donor side of photosystem 2. Photosynth. Res. **46:** 219-225.

**Klimov V.V., Allakhverdiev S.I., Feyziev Ya.M., Baranov S.V.** (1995b) Bicarbonate requirement for the donor side of photosystem II. FEBS Lett. **363:** 251-255.

**Klimov V.V., Hulsebosch R.J., Allakhverdiev S.I., Wincencjusz H., van Gorkom H.J., Hoff A.J.** (1997) Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of photosystem II. Biochemistry **36:** 16277-16281.

**Kodera Y., Hara H., Astashkin A.V., Kawamori A.** (1995) EPR study of trapped tyrosine $Z^+$ in Ca-depleted photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **1232:** 43-51.

**Loll B., Kern J., Saenger W., Zouni A., Biesiadka J.** (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. Nature **438:** 1040-1044.

**Metzner H.** (1978) Oxygen evolution as an energetic problem. Metzner H. (Ed.) Photosynthetic oxygen evolution. New York: Academic Press, 59-76.

**Petrouleas V., Deligiannakis Y., Diner B.A.**

(1994) Binding of carboxylate anions at the non-heme Fe(II) of PSII. II. Competition with bicarbonate and effects on the $Q_A/Q_B$ electron transfer rate. Biochim. Biophys. Acta **1188:** 271-277.

**Petrouleas V., Diner B.A.** (1990) Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of the photosystem II reaction center. I. NO binds to the acceptor-side non-heme iron. Biochim. Biophys. Acta **1015:** 131-140.

**Rutherford A.W., Zimmermann J.-L.** (1984) A new EPR signal attributed to the primary plastosemiquinone acceptor in photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **767:** 168-175.

**Seidler A.** (1996) The extrinsic polypeptides of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **1507:** 161-179.

**Shevela D., Klimov V.V., Messinger J.** (2007) Interactions of photosystem II with bicarbonate, formate and acetate. Photosynth. Res. **94:** 247-264.

**Snel J.F.H., van Rensen J.J.S.** (1984) Reevaluation of the role of bicarbonate and formate in the regulation of photosynthetic electron flow in broken chloroplasts. Plant Physiol. **75:** 146-150.

**Stemler A.** (1977) The binding of bicarbonate ions to washed chloroplast grana. Biochim. Biophys. Acta **460:** 511-522.

**Stemler A.** (1980) Inhibition of photosystem II by formate: Possible evidence for a direct role of bicarbonate in photosynthetic oxygen evolution. Biochim. Biophys. Acta **593:** 103-112.

**Stemler A.** (1982) The functional role of bicarbonate in photosynthetic light reaction II. Govindjee (Ed.) *Photosynthesis, development, carbon metabolis m, and plant productivity*, Vol. 2. New York: Academic Press, 513-539.

**Stemler A., Babcock G.T., Govindjee** (1974) The effect of bicarbonate on photosynthetic oxygen evolution in flashing light in chloroplast fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71:** 4679-4683.

**Stemler A., Govindjee** (1973) Bicarbonate ions as a critical factor in photosynthetic oxygen evolution. Plant Physiol. **52:** 119-123.

**Stemler A., Lavergne J.** (1997) Evidence that formate destabilizes the $S_1$ state of the oxygen-evolving mechanism in photosystem II. Photosynth. Res. **51:** 83-92.

**Ulas G., Olask G., Brudvig G.W.** (2008) Evidence against bicarbonate bound in the $O_2$-evolving complex of photosystem II. Biochemistry **47:** 3073-3075.

**Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N.** (2011) Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at an atomic resolution of 1.9Å. Nature **473:** 55-60.

**Van Rensen J.J.S., Xu C., Govindjee** (1999) Role of bicarbonate in photosystem II, the water-plastoquinone oxido-reductase of plant photosynthesis. Physiol. Plant. **105:** 585-592.

**Vermaas W.F.J., Rutherford A.W.** (1984) EPR measurements on the effects of bicarbonate and triazine resistance on the acceptor side of photosystem II. FEBS Lett. **175:** 243-248.

**Vernotte C., Briantais J.-M., Astier C., Govindjee** (1995) Differential effects of formate in single and double mutants of $D_1$ in *Synechocystis sp.* PCC 6714. Biochim. Biophys. Acta **1229:** 296-301.

**Völker M., Ono T., Inoue Y., Renger G.** (1985) Effect of trypsin on the PSII particles. Correlation between Hill activity, Mn-abundance and peptide pattern. Biochim. Biophys. Acta **806:** 25-34.

**Wincencjusz H., Allakhverdiev S.I., Klimov V.V., van Gorkom H.J.** (1996) Bicarbonate-reversible formate inhibition at the donor side of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **1273:** 1-3.

**Xiong J., Minagava J., Crofts A., Govindjee** (1998) Loss of inhibition in newly constructed photosystem II D1 mutants, D1-R275E and D1-R257M, of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta **1365:** 473-491.

**Yruela I., Allakhverdiev S., Ibarra J.V., Klimov V.V.** (1998) Bicarbonate binding to the water oxidizing complex in photosystem II: A Fourier transform infrared spectroscopy study. FEBS Lett. **425:** 396-400.

**Zimmermann J.-L., Rutherford A.W.** (1984) EPR studies of the oxygen-evolving enzyme of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **767:** 160-167.

**Zouni A., Witt H.-T., Kern J., Fromme P., Krauss N., Saenger W., Orth P. (**2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. Nature 409: 739-743.

**Y.M. Feyziyev**

**Bikarbonat və Ikinci Fotosistemin Fəaliyyəti**

Bikarbonat ionlarının ikinci fotosistemdə rolu formiatla ($HCO_2^-$) müqayisəli şəkildə öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, bikarbonat və quruluşca ona yaxın olan formiat ionları ikinci fotosistemdə xlorofilin dəyişən fluoressensiyasının intensivliyinin artmasına gətirir. Lakin, bu iki komponentin birgə təsiri dəyişən fluoressensiyanın intensivliyini artırmayıb, əksinə, bikarbonat ionlarının təklikdə təsiri zamanı müşahidə olunan səviyyəyə endirir. Təcrübələr göstərmişdir ki, formiat ionları ikinci fotosistemin $S_2$ pilləsinin zolaqlı EPR siqnalının (g = 2.00) işıqla induksiyasını inhibirləşdirir, $Q_A^{\bullet-}Fe^{2+}$ akseptor kompleksinə məxsus g = 1.82 siqnalının induksiyasını isə stimullaşdırır. Bu zaman ikinci fotosistemdə oksigen ayrılmasının inhibirləşməsi və tirozin $Y_Z^{\bullet}$ radikalının induksiyası da müşahidə edilsə də, bu hadisələrin formiatın bikarbonatla rəqabətsiz təsiri ilə baş verdiyi təklif edilmişdir. Alınmış nəticələrin analizi göstərir ki, bikarbonat suyun oksidləşmə reaksiyaları üçün zəruri komponent olmayıb, ikinci fotosistemin akseptor tərəfində fəaliyyət göstərməklə, plastoxinonlar $Q_A$ və $Q_B$ arasında elektron daşınmasını idarə edir.

**Y.M. Feyziyev**

**Bicarbonate and Function of Photosytem II**

The scope of this work is an identifying functional place of bicarbonate ($HCO_3^-$) in photosystem II. Both exogenous bicarbonate and formate ($HCO_2^-$) stimulate the increase of variable fluorescence of chlorophyll. However, the increase of fluorescence is not enhanced by combined action of $HCO_3^-$ and $HCO_2^-$. It was found that formate inhibits the formation of the $S_2$ state multiline EPR signal (g = 2.00) concomitant with stimulation of the $Q_A^{\bullet-}Fe^{2+}$ signal at $g$ = 1.82. Similarly to the multiline signal intensity, formate also inhibite the oxygen evolution function of PSII. The inhibitory effects of formate give the impression to the retarded electron transfer from water oxidation center to the tyrosine $Y_Z^{\bullet}$. The results suggests that the acceptor side of photosystem II is a $HCO_3^-$-functional site, while the formate effects ascribed both the acceptor and donor side of photosystem II. Instead of earlier studies, clayming that BC can accelerate electron transfer in both acceptor and donor side of PSII, in this study the function of bicarbonate is suggested as delaying the electron flow in its acceptor side.